

加味四逆散对睡眠剥夺大鼠 PFC 和海马 CA3 区 NMDA 受体表达的调节作用

范新六^{1,3} 李峰² 宋月晗² 洪志强³ 马佳美² 刘燕²

(1 世界中医药学会联合会北京御方堂中医门诊部,北京市朝阳区小营路19号,100101; 2 北京中医药大学; 3 世界中医药学会联合会)

摘要 目的:研究睡眠剥夺大鼠 PFC 和海马 CA3 区 NMDAR 2B 和 NMDAR 2B(Tyr¹⁴⁷²)表达的变化,并观察加味四逆散对其影响。方法:采用多平台法,进行连续睡眠剥夺168h,使用 Western blot 技术分析大鼠 PFC 和海马 CA3 区 NMDAR 2B 和 NMDAR 2B(Tyr¹⁴⁷²)表达的变化。结果:与对照组比较,模型组大鼠 PFC 和海马 CA3 区 NMDA 受体 NMDAR 2B 和 NMDAR 2B(Tyr¹⁴⁷²)蛋白质的表达明显减少($P < 0.05$)。与模型组比较,加味四逆散组大鼠 PFC 和海马 CA3 区 NMDAR 2B 和 NMDAR 2B(Tyr¹⁴⁷²)蛋白质的表达均明显增加($P < 0.05$)。结论:加味四逆散能上调睡眠剥夺导致 PFC 区 NMDAR2B、NMDAR2B(Tyr¹⁴⁷²)表达的降低;也能上调睡眠剥夺导致海马 CA3 区 NMDAR2B 表达的降低。

关键词 睡眠剥夺;加味四逆散;NMDA 受体

Regulation of Jiawei Sini Powder on Expression of PFC and CA3 NMDA Receptors

Fan Xinliu^{1,3}, Li Feng², Song Yuehan², et al.

(1. Yu Fang Tang TCM Clinics of WFCMS, Add.: No. 19, Xiaoying Road, Chaoyang District, Beijing, Post code: 100101; 2. Beijing University of Chinese Medicine; 3. WFCMS)

Abstract Objective: To investigate expression of PFC, NMDAR 2B and NMDAR 2B(Tyr¹⁴⁷²) in rats deprived of sleep, and the impact of Jiawei Sini Powder. **Methods:** Using multi-platform to deprive rats of sleep for consecutively 168h, and using Western blot to analyze changes of expression of PFC, NMDAR 2B and NMDAR 2B(Tyr¹⁴⁷²). **Results:** Compared with control group, the model group decreased significantly in above mentioned expressions ($P < 0.05$). Compared with the model group, the rats taken Jiawei Sini Powder had the expressions increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jiawei Sini Powder can raise the decreased expressions of PFC, NMDAR 2B and NMDAR 2B(Tyr¹⁴⁷²) in rats caused by sleep deprivation.

Key Words Sleep deprivation; Jiawei Sini Powder; NMDA receptor

NMDA 受体依赖性长时程增强(Long-term Potentiation, LTP)是突触可塑性的重要形式,而 NMDA 受体 NR2 亚基是其信号转导通路的关键环节;前额叶皮质和海马 CA3 区是参与学习与记忆的两个重要脑区。因此,本实验探讨睡眠剥夺大鼠前额叶皮质和海马 CA3 区与突触可塑性关系密切的 NMDA 受体 NR2 亚基(含磷酸化位点)蛋白质表达的变化及加味四逆散对其调节作用。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 二级 Spargue-Dawley 雄性成年大鼠 50 只,体重(250±20)g,购自北京维通利华实验动物有限公司。将大鼠适应性喂养 3d 后随机分为正常对照组(A组)、模型组(B组)、四逆散组(C组)、生慧汤组(D组)、加味四逆散组(E组),共 5 组,每组 6 只。

1.2 药物 实验所用的中药复方分别选用《伤寒论》的四逆散(甘草、枳实、柴胡、芍药)、《辨证录》的生慧汤(熟地黄、山茱萸、远志、生酸枣仁、柏子仁、茯神、人参、石菖蒲、白芥子)、加味四逆散由四逆散和生慧汤方组成。上述复方由北京东直门医院制剂室以严格工

艺制成免煎颗粒。

1.3 试剂与仪器 NMDAR2B、 β -actin(Santa Cruz, USA),NMDAR 2B(Tyr¹⁴⁷²)(Abcam, USA)。蛋白定量试剂盒、ECL 超敏发光液、5×上样缓冲液(北京普利来基因技术有限公司)。PMSF(Merck, Germany),丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、SDS(Amresco, USA)。PVDF 膜(Millipore, USA)。垂直电泳仪、电转槽(Bio-Rad, USA)。

1.4 方法

1.4.1 模型制作 采用 D. Suchecki 改良多平台法进行睡眠剥夺。在剥夺箱中放置 10 个平台,在平台周边注满水,把 6 只大鼠放置平台上,当大鼠进入异相睡眠时,由于全身肌肉张力降低,节律性地垂头触水或落入水中觉醒,从而使动物始终不能进入异相睡眠。将大鼠进行异相睡眠剥夺 168h。自造模第 1 天始, C、D、E 组每日分别灌服四逆散、生慧汤、四慧合剂,按人体用药量换算成大鼠等效剂量作为大鼠用药量,这 3 组的给药量分别为 2.5g/kg、13.75g/kg、16.25g/kg,灌胃容积为 1mL/kg。A、B 组则灌服等体积的蒸馏水。

1.4.2 取材 在 SD168h 点,每组随机取 6 只大鼠,2%戊巴比妥钠腹腔麻醉(40mg/kg),断头,在超净台

内冰上取脑,分别剥离出右侧 PFC 和海马 CA3 区,将样本分别放入 1.5mL 灭菌的离心管中,埋入干冰,迅速转移到 -70℃ 的低温冰箱中。

1.4.3 Western blot 流程 使用微电动匀浆器匀浆后,采用 RIPA 裂解液(预冷)提取细胞总蛋白。用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度后, -20℃ 保存待测。蛋白标本以 1:4 加入 5 上样缓冲液,在 5% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离。每条泳道蛋白上样量为 30μg。电泳结束后,用电转仪将蛋白质转移至 PVDF 膜上。转移后的 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1h,加入一抗兔抗 NMDAR2B 或 NMDAR2B(Tyr¹⁴⁷²)(1:300),4℃ 过夜。用 TBS 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:2000),室温孵育 1h, TBS 充分洗膜。采用超敏发光液进行曝光, X 线显影。将胶片的蛋白质条带在图像分析系统上测定其灰度值。

1.5 图像处理 采用凝胶图像处理软件检测出各条带的像素灰度值,用各指标的像素密度值除以相应的 β-Actin 的像素灰度值,求出各指标的相对像素灰度值。

1.6 统计学方法 实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 *t* 检验,组间比较用单因素方差分析检验。运用 SAS8.2 软件进行分析。

2 结果

2.1 各组大鼠 PFC 和海马 CA3 区 NMDAR2B 表达的改变 与对照组比较,模型组大鼠 PFC 和海马 CA3 区 NMDA 受体 NR2B 蛋白质的表达明显减少($P < 0.05$)。与模型组比较,加味四逆散组大鼠 PFC 和海马 CA3 区 NMDA 受体 NR2B 蛋白质的表达均明显增加($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 大鼠各脑区 NMDAR2B 表达的改变($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	PFC	CA3
正常对照	0.19112 ± 0.02717	0.14372 ± 0.03348
模型	0.062 ± 0.04969 *	0.05126 ± 0.03578 *
四逆散	0.09117 ± 0.0437	0.10759 ± 0.02827
生薑汤	0.1104 ± 0.05935	0.1343 ± 0.0483
加味四逆散	0.19724 ± 0.00822 ^Δ	0.15652 ± 0.0224 ^Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ^Δ $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠 PFC 和海马 CA3 区 NMDA 受体 NR2B (Tyr¹⁴⁷²) 表达的改变 与对照组比较,睡眠剥夺 168h 后,大鼠 PFC 脑区 NMDA 受体 NR2B(Tyr¹⁴⁷²)蛋白质的表达明显减少($P < 0.05$)。与模型组比较,加味四逆散组大鼠 PFC 脑区 NMDA 受体 NR2B(Tyr¹⁴⁷²)蛋白质的表达均明显增加($P < 0.05$)。各组大鼠海马 CA3 区 NMDA 受体 NR2B(Tyr¹⁴⁷²)蛋白质的表达无明显差

异。见表 2。

表 2 大鼠各脑区 NMDAR2B(Tyr¹⁴⁷²)表达的改变($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	PFC	CA3
正常对照	0.36437 ± 0.1896	0.50648 ± 0.27482
模型	0.15883 ± 0.14881 *	0.40589 ± 0.22576
四逆散	0.22766 ± 0.2104	0.55887 ± 0.30963
生薑汤	0.32659 ± 0.19869	0.09098 ± 0.12378
加味四逆散	0.72775 ± 0.2441 ^Δ	0.49432 ± 0.23642

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ^Δ $P < 0.05$ 。

3 讨论

研究表明,前额叶皮质和海马 CA3 区是参与学习与记忆的重要脑区。人体和动物实验的研究都提示前额叶脑区与工作记忆之间存在紧密的联系^[1]。功能神经成像研究表明事件记忆的编码过程与左侧前额叶的激活是有关的,而记忆的提取则与右侧前额叶的激活有关,前额叶的背外侧区是参与工作记忆的最重要的脑区。海马 CA3 区在陈述性记忆中扮演主要的角色。譬如在记忆编码上,CA3 - NR1 敲除显示损伤了需要快速获得联合信息的任务学习^[2]。学习与记忆神经生物学基础为突触可塑性的改变,而 LTP 是突触可塑性重要的功能指标。NMDAR2B 在 NMDA 受体依赖性 LTP 诱导和维持处于主导地位。NMDAR2B 主导的 NMDA 受体的膜表达和激活受到丝氨酸和酪氨酸位点磷酸化的特异性调控。与 Ser1480 位点磷酸化能减少 NMDA 受体在膜的表达量不同,其 Tyr¹⁴⁷²位点的磷酸化能稳固 NMDA 受体在胞膜的稳定性^[3]。

根据中医五藏神理论,心藏神,肝藏魂,肾藏精。加味四逆散以补肾、养心、疏肝立法,能调节心肝肾功能异常,使肝肾二藏在心“任物”功能主宰下调控学习,记忆的编码、巩固、再现等过程。本研究证明,加味四逆散能上调睡眠剥夺导致动物 PFC 区 NMDAR2B、NMDAR2B(Tyr¹⁴⁷²)表达的降低;也能上调睡眠剥夺导致海马 CA3 区 NMDAR2B 表达的降低。根据既往研究结果^[3],加味四逆散能改善睡眠剥夺动物学习记忆能力,与调节 PFC 和 CA3 区 NMDAR2B 的蛋白质和基因表达有关。

参考文献

- [1] Bussey TJ, Wise SP, Murray EA. The role of ventral and orbital PFC in conditional visuomotor learning and strategy use in rhesus monkeys (Nacacumalatta). Behav Neurosci, 2001, 115(6): 971 - 982.
- [2] Nakazawa K, Quirk MC. Requirement for hippocampal C. A3 NMDA receptors in associative memory recall. science, 2002, 297(5579): 211 - 218.
- [3] 范新六, 李峰, 宋月晗, 等. 四逆散对疲劳大鼠学习记忆及海马 NMDA 受体亚基 NR2A、NR2B 和 EphB2 受体 mRNA 表达的影响. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(4): 512 - 516.

(2012-02-28 收稿)